# Translation



RECEIVED 1659 AUG 23 2000

# **PCT**

TEXTH CENTER

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference See Notification of Transmittal of International FOR FURTHER ACTION 9572 Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) International application No. International filing date (day/month/year) Priority date (day/m

PCT/EP98/05738						
International Patent Classification (IPC) or n C12Q 1/68, C07H21/00	ational classification and IPC					
Applicant BIOTECON GESELLSCHAFT FI	ÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENT MBH	WICKLUNG UND CONSULTING				
This international preliminary example Authority and is transmitted to the approximately approximately are approximately as a second control of the approximately app	mination report has been prepared by the pplicant according to Article 36.	is International Preliminary Examining				
2. This REPORT consists of a total of	4 sheets, including this cove	r sheet.				
been amended and are the ba	nied by ANNEXES, i.e., sheets of the descrasis for this report and/or sheets containing 607 of the Administrative Instructions und	rectifications made before this Authority				
These annexes consist of a to	otal of sheets.					
3. This report contains indications relat	ing to the following items:					
I Basis of the report	I Basis of the report					
II Priority	II Priority					
III Non-establishment	of opinion with regard to novelty, inventiv	e step and industrial applicability				
IV Lack of unity of inv	vention					
V Reasoned statement citations and explan	t under Article 35(2) with regard to novelty nations supporting such statement	, inventive step or industrial applicability;				
VI Certain documents	cited					
VII Certain defects in the	ne international application					
VIII Certain observations on the international application						
	T-					
Date of submission of the demand	Date of submission of the demand  Date of completion of this report					
09 March 1999 (09.03.1999) 10 November 1999 (10.11.1999)						
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office	Authorized officer					
D-80298 Munich, Germany						
acsimile No. 49-89-2399-4465 Telephone No. 49-89-2399-0						

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
09 March 1999 (09.03.1999)	10 November 1999 (10.11.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany	Authorized officer
Facsimile No. 49-89-2399-4465	Telephone No. 49-89-2399-0



International application No.

PCT/EP98/05738

I. Basis of th	ne report				
1. This report	rt has been drawn tile 14 are referred to	on the basis of (A) in this report as	Replacement shee "originally filed"	ts which have been furnished to the and are not annexed to the rep	he receiving Office in response to an invitation port since they do not contain amendments [V
	the internationa	l application as o	riginally filed.		AUG 23 2001
$\boxtimes$	the description,	pages	1-3,5-20	_, as originally filed,	
		pages		_, filed with the demand,	TECH CENTER 1600/29
		pages	4,4a	_, filed with the letter of _	20 October 1999 (20.10.1999) ,
		pages		_, filed with the letter of _	
$\boxtimes$	the claims,	Nos		_ , as originally filed,	
e		Nos.		, as amended under Article	19,
		Nos.	MI	_, filed with the demand,	
		Nos.	1-18	_, filed with the letter of	20 October 1999 (20,10.1999),
				i .	'
	the drawings,	sheets/fig		_ , as originally filed,	
		sheets/fig		_, filed with the demand,	*
		sheets/fig		_, filed with the letter of	
		sheets/fig		_, filed with the letter of	
2. The amend	ments have resulte	ed in the cancella	ation of:		
	the description,	pages			
	the claims,	Nos.			
一	the drawings,	sheets/fig			
لبيتا	····	J.10010/115			
to go	report has been es beyond the disclo	osure as filed, as	ome of) the am indicated in the	endments had not been made, E Supplemental Box (Rule 70	since they have been considered 2(c)).
See	supplemen	ntal shee	et.		
					İ

nternational application No.
PCT/EP 98/05738

### I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

Pages which were submitted on 28.12.1998: Pursuant to PCT Rule 13ter.1(f), sequence listings submitted after the filing date and not characterised as amendments shall not be considered part of the description and are not appended to this report as an annex either.

International application No.
PCT/EP 98/05738

V.	Reasoned statement under Article 3 citations and explanations supporti	35(2) with regard to novelty	, inventive step or industrial app	licability;
1.	Statement			
	Novelty (N)	Claims	1-18	YES
		Claims		NO
	Inventive step (IS)	Claims	1-18	YES
		Claims		NO
	Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
		Claims		NO

2. Citations and explanations

All of the present claims refer to specific nucleic acid sequences which permit the detection of bacteria of the genus *Pseudomonas*. The claimed nucleic acid sequences are neither disclosed in the prior art, nor are they obvious therefrom. Furthermore, the selected sequences are able to detect a surprisingly large selection of different strains of the species *Pseudomonas aeruginosa* without producing false positive results with bacteria of other species or genera (see Table 1).

Claims 1-18 thus meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step (PCT Art. 33(2) and (3)).

VII. Certain defects in the	international application
-----------------------------	---------------------------

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The description is not in conformity with the claims, in contravention of PCT Rule 5.1(a) (iii).

PCT/EP 98/05738

### VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The functional feature "wherein the nucleic acid molecule permits the detection of bacteria of the genus Pseudomonas" should have been included in Claim 5 in such a way that it clearly refers to all of the variants (i)-(iv) (PCT Art. 6).

# VERTRAG JER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

# **PCT**

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 9572-BIOTECON	Recher	itteilung über die Übermittlung des internationalen chenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit nd, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
PCT/EP 98/05738	09/09/1998	09/09/1997
Anmelder BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR I	BIOTECHNOLOGISCHet	al
Dieser internationale Recherchenbericht wurd Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem In Dieser internationale Recherchenbericht umfa	ternationalen Büro übermittelt.	chenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Blätter.
X Darüber hinaus liegt ihm jev	veils eine Kopie der in diesem Be	icht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.
Grundlage des Berichts     a. Hinsichtlich der Sprache ist die inte durchgeführt worden, in der sie eing	rnationale Recherche auf der Gru gereicht wurde, sofern unter diese	ndlage der internationalen Anmeldung in der Sprache n Punkt nichts anderes angegeben ist.
Die internationale Recherch Anmeldung (Regel 23.1 b))		der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen
Recherche auf der Grundlage des S		
zusammen mit der internation	onalen Anmeldung in computerles	barer Form eingereicht worden ist.
X bei der Behörde nachträglic	h in schriftlicher Form eingereicht	worden ist.
X bei der Behörde nachträglic	h in computertesbarer Form einge	reicht worden ist.
Die Erklärung, daß das nach internationalen Anmeldung	nträglich eingereichte schriftliche im Anmeldezeitpunkt hinausgeht,	Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der wurde vorgelegt.
Die Erklärung, daß die in ∞ wurde vorgelegt.	mputerlesbarer Form erfaßten Inf	ormationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen,
2. Bestimmte Ansprüche hal	oen sich als nicht recherchierb	ır erwiesen (siehe Feld I).
3. MangeInde Einheitlichkeit	der Erfindung (siehe Feld II).	
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfin	dung	
<u></u>	ereichte Wortlaut genehmigt.	
wurde der Wortlaut von der	Behörde wie folgt festgesetzt:	
5. Hinsichtlich der <b>Zusammenfassung</b>		
wurde der Wortlaut nach Re	innerhalb eines Monats nach de	ebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der n Datum der Absendung dieses internationalen
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen	st mit der Zusammenfassung zu	veröffentlichen; Abb. Nr
wie vom Anmelder vorgesch	nlagen	keine der Abb.
weil der Anmelder selbst ke	ine Abbildung vorgeschlagen hat.	
weil diese Abbildung die En	indung besser kennzeichnet.	

J

# VERTRAGER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

# **PCT**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalt	S WEITERES S	iehe Mitteilung über	die Übermittlung des internationalen
9572-BIOTECON	F	Recherchenberichts (F utreffend, nachsteher	Formblatt PCT/ISA/220) souris coursis
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmelded (Tag/Monat/Jahr)		(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr,
PCT/EP 98/05738	09/09/199	98	09/09/1997
BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR	BIOTECHNOLOGISCH.	et al	-
Dieser internationale Recherchenbericht w Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem	urde von der Internationalen R Internationalen Büro übermitte	echerchenbehörde er Ilt.	rstellt und wird dem Anmelder gemäß
Dieser internationale Recherchenbericht ur  X  Darüber hinaus liegt ihm j	nfaßt insgesamt <u>3</u> eweils eine Kopie der in diesei	Blätter. m Bericht genannten	Unterlagen zum Stand der Technik bei.
1. Grundlage des Berichts			
A. Hinsichtlich der Sprache ist die in durchgeführt worden, in der sie ei	5 Maria Maria Golding and Colored	aleaeth i drikt Hichis a	anderes angegeben ist.
•	, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,		gereichten Übersetzung der internationalen
	len Anmeldung offenbarten <b>Nu</b> Sequenzprotokolls durchgefül eldung in Schriflicher Form en		minosäuresequenz ist die internationale
zusammen mit der interna	tionalen Anmeldung in comput	erlesbarer Form einge	ereicht worden ist.
bei der Behörde nachträgli	ch in schriftlicher Form eingere	eicht worden ist.	
bei der Behörde nachträgli	ch in computerlesbarer Form e	ingereicht worden ist	· t.
Die Erklärung, daß das na internationalen Anmeldung	chträglich eingereichte schriftlic i im Anmeldezeitpunkt hinausg	che Sequenzprotokoli eht, wurde vorgelegt.	I nicht über den Offenbarungsgehalt der
Die Erklärung, daß die in c wurde vorgelegt.	omputerlesbarer Form erfaßter	n Informationen dem	schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen,
2. Bestimmte Ansprüche ha	ben sich als nicht recherchi	erbar erwiesen (sieh	ne Feld I).
3. Mangelnde Einheitlichkei	t der Erfindung (siehe Feld II)	<b>).</b>	*
1. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfli	ndung		
wird der vom Anmelder ein	gereichte Wortlaut genehmigt.		
wurde der Wortlaut von der	Behörde wie folgt festgesetzt:		
i. Hinsichtlich der <b>Zusammenfassung</b>			
wurde der Wortlaut nach Re Anmelder kann der Behörde Recherchenberichts eine St	ellungnahme vorlegen.	dem Datum der Abse	
. Folgende Abbildung der <b>Zeichnungen</b> i	st mit der Zusammenfassung z	u veröffentlichen: Abi	b. Nr
wie vom Anmelder vorgesch	lagen		keine der Abb.
weil der Anmelder selbst kei weil diese Abbildung die Erfi	ne Abbildung vorgeschlagen h	at.	
	ndung kasa-at.		

# INTERNATIONALEF CHERCHENBERICHT

a. Klassifizierung des anmeldungsgegenstandes IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

### B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12Q

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Wänrend der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ;JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4. Januar 1996 siehe Seite 40, Zeile 3 - Seite 41, Zeile 3; Ansprüche 28-30	1-4,9-22
Y	ZHU Q ET AL: "Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction" JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 80, 1966, Seiten 244-51, XP002096352 siehe das ganze Dokument	1-4,9-22

° Besondore Votegories and a service of the service	·
Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :     "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	Enindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer T\u00e4tigkeit beruhend betrachtet werden
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen, Apmeldedatum, aber noch	erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden  "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist  "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
12. März 1999	29/03/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Bediensteter
NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Osborne, H

entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

# INTERNATIONALER HERCHENBERICHT

onales Aktenzeichen
PCT/EP 98/05738

C.(Fortsetz	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	- 1/ L1 J	0/05/38
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommende	n Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism" ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA, Bd. 44, Nr. 2, 1995, Seiten 111-7, XP002096353 siehe Zusammenfassung und Diskussion		1-4,9-22
Υ .	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument		1-4,9-22
<b>Y</b>	EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4. Oktober 1989 siehe das ganze Dokument		1
Y	EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3. Mai 1989 siehe Seite 3, Zeile 50 - Seite 5		1
		÷	
			*

# INTENTIONAL SEARCH REPORT



	itent document in search report	t	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO	9600298	A	04-01-1996	AU BR	2924695 A 9508101 A	19-01-1996 30-12-1997
				CA	2193101 A	04-01-1996
				CZ	9603819 A	15-04-1998
				EP	0769068 A	23-04-1997
				, JP	10501976 T	24-02-1998
ΕP	0739988	Α	30-10-1996	DE	19515891 A	31-10-1996
				JP	9107998 A	28-04-1997
EP	0335633	Α	04-10-1989	AT	122103 T	15-05-1995
				DE	68922428 D	08-06-1995
				DE	68922428 T	25-01-1996
				JP	2150300 A	08-06-1990
				U\$	5658726 A	19-08-1997
ΕP	0314294	Α	03-05-1989	US	5089386 A	18-02-1992
				AT	110419 T	15-09-1994
				ΑU	2213488 A	16-03-1989
				DE	3851200 D	29-09-1994
				DE	3851200 T	23-03-1995
				DK	503888 A	13-03-1989
				FI	884164 A	12-03-1989
				JP	1304899 A	08-12-1989



# EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 88 30 8820

D	OCUMENTS CONS				
Category	Citation of document wi of rele	evant claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)		
X		EM., vol. 71, no. 3, 1988, pa al.: "Comparative studies of ssay for Listeria in foods"	ges 1,2,	8,9, 14	C 12 Q 1/68 C 12 Q 1/04 // C 07 H 21/02
Α	IDEM		15,1	16	
Α		MICROBIOLOGY, vol. 131, 19 W. LUDWIG et al.: "The phy ccus and Enterococcus"		3	
Α	2256-2259, American Socie	DL., vol. 53, no. 9, 1987, pag sty for Microbiology; A.R. DA tic Listeria monocytogenes t ation"	TTA	5,16	
P,A	FR-A-2 616 808 (WASHIN SEARCH FOUNDATION) * Pages 15,16; claims 1-9 *	IGTON STATE UNIV. RE-	1,15	5,16	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)
					C 12 Q
	The present search report has	been drawn up for all claims			
	Place of search	Date of completion of sear	ch		Examiner
Y: A: O: P:	The Hague  CATEGORY OF CITED DOCT particularly relevant if taken alone particularly relevant if combined wil document of the same catagory technological background non-written disclosure intermediate document theory or principle underlying the in-	th another D L	the filing dat : document ci : document ci	ted in the	ther reasons

## INTERNATIONALEP CHERCHENBERICHT

			PCT/EP 98	Aktenzeichen 3/05738
a. klassi IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C12Q1/68			
Nach der In	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Kla	assifikation und der IPK		
B. RECHE	RCHIERTE GEBIETE			
Recherchier IPK 6	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymb C12Q	oole )		
Recherchie	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, s	oweit diese unter die rech	erchierten Gebiete	e fallen
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (i	Name der Datenbank und	d evtl. verwendete	Suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN			
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angab	oe der in Betracht komme	nden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ;, GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEI H) 4. Januar 1996 siehe Seite 40, Zeile 3 - Seite 4 3; Ansprüche 28-30	1-4,9-22		
Y	ZHU Q ET AL: "Detection of Salmo typhi by polymerase chain reaction JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 80, 1966, Seiten 244-51, XPOO siehe das ganze Dokument	1-4,9-22		
1		-/		
	-	,	i	
	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang F	atentfamilie	
"A" Veröffer aber ni  "E" älteres [	ntlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, anutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht utlichung, die vor dem internationalen. Anmelderaturn aber nech	oder dem Prioritätsd. Anmeldung nicht kol Erfindung zugrundel Theorie angegeben i "X" Veröffentlichung von i kann allein aufgrund erfinderlscher Tätigk "Y" Veröffentlichung von i kann nicht als auf ert werden, wenn die Ve Veröffentlichungen d diese Verbindung für "&" Veröffentlichung, die i	atum veröffentlicht (diert, sondern nut egenden Prinzips st pessonderer Bedeu dieser Veröffentlich att beruhend betra besonderer Bedeu inderischer Tätigk eröffentlichung mit eiser Kategorie in einen Fachmann	tung; die beanspruchte Erfindung eit beruhend betrachtet einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und nahellegend ist Patentfamilie ist

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016

12. März 1999

1

29/03/1999

Bevollmächtigter Bediensteter

Osborne, H

# INTERNATIONALER THERCHENBERICHT

Int. .onales Aktenzeichen
PCT/EP 98/05738

	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie®	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komm	nenden Teile Betr. Anspruch Nr.
Y	KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism" ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA, Bd. 44, Nr. 2, 1995, Seiten 111-7, XP002096353 siehe Zusammenfassung und Diskussion	1-4,9-22
Y	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument	1-4,9-22
Y	EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4. Oktober 1989 siehe das ganze Dokument	1
Y	EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3. Mai 1989 siehe Seite 3, Zeile 50 - Seite 5	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

· comment Box

.iational Application No PCT/EP 98/05738

AND AND STREET

Patent documen cited in search rep		Publication date	1	Patent family member(s)	Publication date
WO 9600298	Α	04-01-1996	AU	2924695 A	19-01-1996
			BR	9508101 A	30-12-1997
			CA	2193101 A	04-01-1996
			CZ	9603819 A	15-04-1998
			EP	0769068 A	23-04-1997
			JP	10501976 T	24-02-1998
EP 0739988	Α	30-10-1996	DE	19515891 A	31-10-1996
			JP	9107998 A	28-04-1997
EP 0335633	Α	04-10-1989	AT	122103 T	15-05-1995
			DE	68922428 D	08-06-1995
			DE	68922428 T	25-01-1996
			JP	2150300 A	08-06-1990
			US	5658726 A	19-08-1997
EP 0314294	Α	03-05-1989	US	5089386 A	18-02-1992
			ΑT	110419 T	15-09-1994
			AU	2213488 A	16-03-1989
			DE	3851200 D	29-09-1994
			DE	3851200 T	23-03-1995
			DK	503888 A	13-03-1989
			FΙ	884164 A	12-03-1989
			JP	1304899 A	08-12-1989



### From the INTERNATIONAL BUREAU

## **PCT**

### **NOTIFICATION OF ELECTION**

(PCT Rule 61.2)

ı		ī	•	-
ı		ı	(	٠

United States Patent and Trademark Office (Box PCT) Crystal Plaza 2 Washington, DC 20231 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing (day/month/year) 18 May 1999 (18.05.99)	in its capacity as elected Office
International application No.	Applicant's or agent's file reference
PCT/EP98/05738	9572-BIOTECON
International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
09 September 1998 (09.09.98)	09 September 1997 (09.09.97)
Applicant	
BERGHOF, Kornelia et al	-

Applicant
BERGHOF, Kornelia et al
The designated Office is hereby notified of its election made:
X in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
09 March 1999 (09.03.99)
in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election X was
was not ;
made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).
7

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Authorized officer

R. E. Stoffel

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

# **PCT**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES	siehe Mitteilung über d	ie Übermittlung des internationalen					
9572-BIOTECON	VORGEHEN  Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5							
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmelde		(Frühestes) Prioritätsdatum (Tay/Monat/Jahr					
DOT/5D 00/05700	(Tag/Monat/Jahr)							
PCT/EP 98/05738	09/09/19	98	09/09/1997					
Annielder								
BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR E	BIOTECHNOLOGISC	let al						
Dieser internationale Recherchenbericht wurd	la van dar Internationalan	Doob orek ont at Kada a	and the second s					
Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Int	ernationalen Büro übermi	rteit.	rstellt und wird dem Anmelder gemäß					
Dieser internationale Recherchenbericht umfa		Blätter.						
Darüber hinaus liegt ihm jew	reils eine Kopie der in die	sem Bericht genannten	Unterlagen zum Stand der Technik bei.					
Grundlage des Berichts								
<ul> <li>a. Hinsichtlich der Sprache ist die inter durchgeführt worden, in der sie eing</li> </ul>	rnationale Recherche auf ereicht wurde, sofern unte	der Grundlage der inter	rnationalen Anmeldung in der Sprache					
<u></u>								
Die internationale Recherch Anmeldung (Regel 23.1 b)) o	e ist auf der Grundlage ei durchgeführt worden.	ner bei der Behörde ein	gereichten Übersetzung der internationalen					
	_	Nucleotid- und/oder A	Aminosäuresequenz ist die internationale					
Recherche auf der Grundlage des S	equenzprotokolis durchge	führt worden, das	minosadiesequenz ist die internationale					
in der internationalen Anmel								
zusammen mit der internatio			gereicht worden ist.					
	bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.							
X bei der Behörde nachträglich								
Die Erklärung, daß das nach internationalen Anmeldung i	nträglich eingereichte schr m Anmeldezeitpunkt hina	iftliche Sequenzprotoko Isgeht, wurde vorgeleg	oll nicht über den Offenbarungsgehalt der it.					
Die Erklärung, daß die in col wurde vorgelegt.	mputerlesbarer Form erfa	3ten Informationen dem	n schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen.					
2. Bestimmte Ansprüche hab	en sich als nicht recher	<b>chierbar erwiese</b> n (sie	ehe Feld I).					
3. Mangelnde Einheitlichkeit								
	3 (****	,						
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfine	dung							
X wird der vom Anmelder eing		iat.						
wurde der Wortlaut von der I	<del>-</del>	-	1					
-			~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~					
5. Hinsichtlich der <b>Zusammenfassung</b>								
wird der vom Anmelder einge								
Anmelder kann der Behörde	gel 38.2b) in der in Feld II innerhalb eines Monats r	l angegebenen Fassun ach dem Datum der Ab	g von der Behörde festgesetzt. Der osendung dieses internationalen					
Hecherchenberichts eine Ste	ellungnahme vorlegen.							
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen is	st mit der Zusammenfassı	ng zu veröffentlichen; ,	Abb. Nr					
wie vom Anmelder vorgesch	=		keine der Abb.					
weil der Anmelder selbst kei	ne Abbildu <mark>ng</mark> vorgeschlag	en hat.						
weil diese Abbildung die Erfi	ndung besser kennzeichn	et.						



# A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

### B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  $IPK\ 6\ C12Q$ 

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
<b>Y</b> .	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ;JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4. Januar 1996 siehe Seite 40, Zeile 3 - Seite 41, Zeile 3; Ansprüche 28-30	1-4,9-22 5-
Y	ZHU Q ET AL: "Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction" JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 80, 1966, Seiten 244-51, XP002096352 siehe das ganze Dokument	1-4,9-22

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie
<ul> <li>Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen</li> <li>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</li> <li>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</li> <li>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</li> <li>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</li> <li>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</li> </ul>	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundellegenden Prinzips oder der ihr zugrundellegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
12. März 1999	29/03/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk	Bevollmächtigter Bediensteter
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Osborne, H



	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie <sup>°</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe de in Betracht kommenden Teil	e Betr. Anspruch Nr.
Y	KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism" ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA, Bd. 44, Nr. 2, 1995, Seiten 111-7, XP002096353 siehe Zusammenfassung und Diskussion	1-4,9-22
Υ	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument	1-4,9-22
Υ	EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4. Oktober 1989 siehe das ganze Dokument	1
Υ	EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3. Mai 1989 siehe Seite 3, Zeile 50 - Seite 5	1
	•	
	'	
	* * *	
		,

1

PCT/EP 98/05738

lm R	echerchenberich	nt	Datum der	N	litalied(er) der	Datum der
angefüh	rtes Patentdokur	ment	Veröffentlichung		Patentfamilie	Veröffentlichung
WO 	9600298	A :	04-01-1996	AU BR CA CZ EP JP	2924695 A 9508101 A 2193101 A 9603819 A 0769068 A 10501976 T	19-01-1996 30-12-1997 04-01-1996 15-04-1998 23-04-1997 24-02-1998
EP	0739988	A 	30-10-1996	DE JP	19515891 A 9107998 A	31-10-1996 28-04-1997
EP 	0335633	A	04-10-1989	AT DE DE JP US	122103 T 68922428 D 68922428 T 2150300 A 5658726 A	15-05-1995 08-06-1995 25-01-1996 08-06-1990 19-08-1997
EP	0314294	Α	03-05-1989	US AT AU DE DE DK FI JP	5089386 A 110419 T 2213488 A 3851200 D 3851200 T 503888 A 884164 A 1304899 A	18-02-1992 15-09-1994 16-03-1989 29-09-1994 23-03-1995 13-03-1989 12-03-1989 08-12-1989

# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07H 21/00

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 99/12949

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

18. März 1999 (18.03.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/05738

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. September 1998 (09.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 39 611.9

9. September 1997 (09.09.97)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTE-CON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGHOF, Komelia [DE/DE]; Rhodeländerweg 85, D-12355 Berlin (DE). GASCH, Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, D-13359 Berlin (DE). BRÄUER, Anja [DE/DE]; Residenzstrasse 100, D-13409 Berlin (DE). GRÖNEWALD, Cordt [DE/DE]; Elberfelder Strasse 12, D-10555 Berlin (DE). WILBORN, Freimut [DE/DE]; Neue Kantstrasse 9, D-14057 Berlin (DE). ROLFS, Amdt [DE/DE]; Schröderstrasse 39, D-18055 Rostock (DE).
- (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: AMINO ACID SEQUENCES AND METHOD FOR ISOLATING BACTERIES FROM THE TYPE GENUS PSEUDOMONAS
- (54) Bezeichnung: NUCLEINSÄURE-SEQUENZEN UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN DER GATTUNG **PSEUDOMONAS**
- (57) Abstract

The invention relates to one or more nucleic acid molecule and a method for isolating bacteries from the type genus pseudomonas, especially pseudomonas aeruginosa. It also relates to a test kit for implementing said method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere Pseudomonas aeruginosa. Femer ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.

# VERTRAG ÜBEF INTERNATIONALE ZUSAMN ARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender:

MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN

PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

BOETERS, Hans D.
BOETERS & BAUER
Bereiteranger 15
D-81541 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN

1 1. Nov. 1999

BOETERS & BAUER
Patentanwälte

09/09/1998

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum

(Tag/Monat/Jahr)

\_1 0. 11. 99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 9572

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05738

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

WICHTIGE MITTEILUNG

09/09/1997

Anmelder

BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECH... et al.

- 1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- 2. Eine Kopie des Berichts wird gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- 3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amts wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

9))

Europäisches Patentamt D-80298 München

Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d

Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Danti, B

Tel. +49 89 2399-8161







# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

# **PCT**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen de	es Anmelders oder Anwalts	T	·	pieke Missell				
9572		WEITERES VORG	EHEN	vorläufigen l	ung über die Übersendung des internationalen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)			
Internationales A	Aktenzeichen	Internationales Anmelde	edatum <i>(Ta</i>	g/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)			
PCT/EP98/0	5738	09/09/1998			09/09/1997			
Internationale Pa C07H21/00	atentklassification (IPK) oder	nationale Klassifikation un	d IPK	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				
Anmelder								
BIOTECON	GESELLSCHAFT FÜR	BIOTECH et al.						
1. Dieser inte Behörde e	ernationale vorläufige Prü erstellt und wird dem Anm	fungsbericht wurde von elder gemäß Artikel 36	der mit ( übermitte	der internatio elt.	nale vorläufigen Prüfung beauftragte			
2. Dieser BE	RICHT umfaßt insgesamt	4 Blätter einschließlic	h dieses	Deckblatts.				
und/o	Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).							
Diese Ania	agen umfassen insgesam	t 6 Blätter.						
3. Dieser Be	richt enthält Angaben zu f	olgenden Punkten:						
1 ⊠	Grundlage des Berichts							
H 🗆	Priorität							
III 🗆	Keine Erstellung eines (	Gutachtens über Neuhe	eit, erfind	erische Tätig	keit und gewerbliche Anwendbarkeit			
IV □		eit der Erfindung			•			
V 🛚	Begründete Feststellung gewerbliche Anwendba	g nach Artikel 35(2) hin rkeit; Unterlagen und E	sichtlich ( rklärunge	der Neuheit, d en zur Stützu	der erfinderische Tätigkeit und der na dieser Feststelluna			
VI 🗆			J					
VII 🛛	Bestimmte Mängel der i	nternationalen Anmeld	ung					
VIII 🛛				g				
Datum der Einrei	ichung des Antrags		Datum	ar Fastimatall	malia Daviahta			

Datum der Einreichung des Antrags

09/03/1999

Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:

Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d

Datum der Fertigstellung dieses Berichts

9 0. 11. 90

Bevollmächtigter Bediensteter

von Ballmoos, P

Fax: +49 89 2399 - 4465

Tel. Nr. +49 89 2399 8174





# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05738

l. Grundlage de	es Berichts
-----------------	-------------

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach

	Artikel 14 hin vorgeleg nicht beigefügt, weil s	wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm keine Änderungen enthalten.):				
	Beschreibung, Seite	n:	·			
	1-3,5-20 🗸	ursprüngliche Fas	ssung			
	4,4a 🗸	eingegangen am		20/10/1999	mit Schreiben vom	20/10/1999
	Patentansprüche, Nr	. a		ï		
	1-18	eingegangen am		20/10/1999	mit Schreiben vom	20/10/1999
2.	. Aufgrund der Änderun	gen sind folgende l	Jnterlagen for	tgefallen:		
	<ul><li>☐ Beschreibung,</li><li>☐ Ansprüche,</li><li>☐ Zeichnungen,</li></ul>	Seiten: Nr.: Blatt:				
3.	angegebenen Gru	ohne Berücksichtig inden nach Auffass sung hinausgehen	ung der Beho	rde über den	erungen erstellt worde Offenbarungsgehalt i	n, da diese aus den n der ursprünglich
1.	Etwaige zusätzliche Be	emerkungen:				
	siehe Beiblatt					
/.	Begründete Feststellt gewerblichen Anwend	ung nach Artikel 3 dbarkeit; Unterlag	5(2) hinsichtl en und Erklär	ich der Neul ungen zur S	heit, der erfinderisch Stützung dieser Fests	en Tätigkeit und der stellung
	Feststellung					3
	Neuheit (N)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-18		
	Erfinderische Tätigkeit	• •	Ansprüche Ansprüche	1-18		
	Gewerbliche Anwendba	` '	Ansprüche Ansprüche	1-18		





# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05738

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

# VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist: siehe Beiblatt

# VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt





# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05738

### Teil I

Seiten, die am 28.12.1998 eingereicht wurden: Gemäss Regel 13ter.1(f) PCT werden Sequenzprotokolle, die nach dem Anmeldetag eingereicht und nicht als Änderungen gekennzeichnet wurden, nicht als Teil der Bescheibung betrachtet und sind diesem Bescheid auch nicht als Annex beigefügt.

### Teil V

Alle vorliegenden Ansprüche beziehen sich auf spezifische Nucleinsäuresequenzen, welche den Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* gestatten. Die beanspruchten Nucleinsäuresequenzen sind im Stand der Technik weder offenbart noch nahegelegt worden. Ausserdem haben die gewählten Sequenzen den Effekt, dass sie eine unerwartet grosse Auswahl verschiedener Stämme der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* nachweisen können, ohne falsch positive Resultate mit Bakterien anderer Spezies oder Genera zu ergeben (siehe dazu Tabelle 1).

Die Ansprüche 1-18 erfüllen somit die Erfordernisse des PCT in bezug auf Neuheit und erfinderische Tätigkeit (Art. 33(2) und (3) PCT).

### Teil VII

Die Beschreibung steht nicht, wie in Regel 5.1 a) iii) PCT vorgeschrieben, in Einklang mit den Ansprüchen.

### Teil VIII

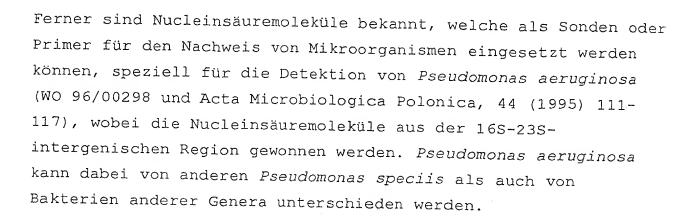
Das funktionelle Merkmal "wobei das Nucleinsäuremolekül den Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* gestattet" hätte in Anspruch 5 so eingefügt werden sollen, dass klar ersichtlich ist, dass es sich auf alle Varianten (i)-(iiii) bezieht (Art. 6 PCT).

Das beschriebene Multiplex-PCR-System bietet zudem wegen der hohen Konservierung der oprI und oprL-Gene wohl kaum die Möglichkeit, durch z.B. Einsatz verschiedener Sonden im Anschluß an die PCR-Reaktion, auch andere klinisch relevante Spezies der Gattung Pseudomonas nachzuweisen, wie z.B. Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas putida oder Pseudomonas stutzeri.

Ziel der hier dargestellten Erfindung war die Etablierung von Nucleinsäuresequenzen, deren Einsatz als Primer und/oder Sonden eine möglichst vollständige Erfassung aller Vertreter der Spezies Pseudomonas aeruginosa sicherstellt. Ein weiteres Ziel der Erfindung war das Auffinden eines Genom-Bereiches, der innerhalb verschiedener Spezies der Gattung Pseudomonas ausreichend hohe Sequenz-Variabilität aufweist, um optional auch den Nachweis anderer Spezies der Gattung Pseudomonas zu ermöglichen, z.B. durch Einsatz verschiedener Varianten von Primern und/oder Sonden in der PCR bzw. im Anschluß an die PCR.

Je nach Größe der zu detektierenden Gruppe von Mikroorganismen und evolutionäre Verwandtschaft (Ähnlichkeit) von abzugrenzenden (nicht zu erfassenden) Mikroorganismen erfordert ein auf differentiellen DNA-Sequenzen basierender Nachweis sehr umfangreiche Vorarbeiten, um jeweils geeignete DNA-Sequenzen mit der gewünschten Spezifität zu finden. Die hier dargelegte Erfindung betrifft solche DNA-Sequenzen, mit denen der Schnellnachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere von Pseudomonas aeruginosa möglich ist.

### /Beschreibung der Erfindung



Auch ist es bekannt, daß die 23S-5S-intergenische Region für Bakterien, bei denen es sich nicht um *Pseudomonas-speciis* handelt, erfolgreich zur Isolierung von speciis- und generaspezifischen Nucleinsäuremolekülen verwendet werden kann (J. Applied Bakteriology, 80 (1996) 244-251 und EP 0 739 988).

# Beschreibung der Erfindung

Gemäß einer Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegene Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst,

### Patentansprüche 1 bis 18 (Artikel 34 Kap. II PCT)

- 1. Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.
- 2. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 verkürzter Sequenz, und zwar der Sequenz des Bereiches oder im Bereich der Nukleotidpositionen 12 bis 131.
- 3. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 verkürzter Sequenz, nämlich
- (i) der SEQ ID NO 3 oder

- (ii) der SEQ ID NO 4 oder
- (iii) der SEQ ID NO 5 oder
- (iv) der zu (i), (ii) und (iii) jeweils komplementären Sequenz.
- 4. Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 2 oder der hierzu komplementären Sequenz.
- 5. Nucleinsäuremolekül, dadurch *gekennzeichnet*, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette
- (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
- (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder

- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist, wobei das Nucleinsäuremolekül den Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas gestattet.
- 6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, dadurch *gekennzeichnet*, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.
- 7. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.
- 8. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß es
- (i) als DNA oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA oder
- (iii) als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

- 9. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert ist, daß bis zu 20 % der Nukleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.
- 10. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch oder

zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

- 11. Ein oder mehrere Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Gegenwart fakultativer Hilfsstoffe und in Form eines Kits für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*.
- 12. Verwendung ein oder mehrerer Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 oder in Form eines Kits gemäß Anspruch 11 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* angehören.
- 13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt oder durch diese Stämme gebildet wird.
- 14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* ausschließlich um *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme handelt.

- 15. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.
- 16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch *gekennzeichnet*, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.
- 17. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleotidposition im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 unterscheidet.
- 18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch *gekennzeichnet*, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 1 unterscheidet.

# PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

 $\mathbf{A3}$ 

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/12949

C12Q 1/68

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

18. März 1999 (18.03.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/05738

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. September 1998 (09.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 39 611.9

9. September 1997 (09.09.97) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTE-CON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGHOF, Kornelia [DE/DE]; Rhodelanderweg 85, D-12355 Berlin (DE). GASCH, Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, D-13359 Berlin (DE). BRÄUER, Anja [DE/DE]; Residenzstrasse 100, D-13409 Berlin (DE). GRÖNEWALD, Cordt [DE/DE]; Elberfelder Strasse 12, D-10555 Berlin (DE). WILBORN, Freimut [DE/DE]; Neue Kantstrasse 9, D-14057 Berlin (DE). ROLFS, Arndt [DE/DE]; Schröderstrasse 39, D-18055 Rostock (DE).
- (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Anderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 27. Mai 1999 (27.05.99)

- (54) Title: AMINO ACID SEQUENCES AND METHOD FOR ISOLATING BACTERIES FROM THE TYPE GENUS PSEUDOMONAS
- (54) Bezeichnung: NUCLEINSÄURE-SEQUENZEN UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN DER GATTUNG **PSEUDOMONAS**

### (57) Abstract

The invention relates to one or more nucleic acid molecule and a method for isolating bacteries from the type genus pseudomonas, especially pseudomonas aeruginosa. It also relates to a test kit for implementing said method.

### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere Pseudomonas aeruginosa. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ational Application No PCT/EP 98/05738

A 01 101	CIEIDATION OF CUD (FOT *** TTEO	······································	
IPC 6	SIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68		
	to International Patent Classification (IPC) or to both national cla	assification and IPC	
	S SEARCHED  documentation searched (classification system followed by class	silication sympols	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
IPC 6			
Document	tation searched other than minimum documentation to the extent	that such documents are included in the fields	searcned
Electronic	data base consulted during the international search (name of da	ata base and, where practical, séarch terms use	od)
C. DOCUM	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of t	he relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); H) 4 January 1996 see page 40, line 3 - page 41, claims 28-30	HEUVERSWYN	1-4,9-22
Y	ZHU Q ET AL: "Detection of Sa typhi by polymerase chain reac JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOG vol. 80, 1966, pages 244-51, X see the whole document	ction" GY,	1-4,9-22
		-/	
X Fu	irther gocuments are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are liste	d in annex.
"A" docur cons "E" earlier filing "L" docum which citate "O" docur othe "P" docur later	ment defining the general state of the lart which is not sidered to be of particular relevance or document but published on or after the international grate or document but published on or after the international grate or document but published on or after the international grate or document but provided to establish the publication date of another ion or other special reason (as specified) ment referring to an oral disclosure, use, exhibition or ar means ment published prior to the international filling date but in than the priority date claimed.	"T" later document published after the in or priority date and not in conflict will cited to understand the principle or invention. "X" document of particular relevance: the cannot be considered novel or cannot be considered novel or cannot be considered to involve an document of particular relevance; the cannot be considered to involve an document is combined with one or ments, such combination being obvining and document member of the same pate.  "8" document member of the same pate.	th the application but theory underlying the eclaimed invention to be considered to document is taken alone a claimed invention inventive step when the more other such docutions to a person skilled int lamily
	12 March 1999	29/03/1999	σαιστισμοιτ
	d mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  NL - 2280 HV Rijswijk  Tel. (-31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	Authorized officer  Osborne . H	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 98/05738

C.(Continua	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	PCT/EP 98/05738
Category ·	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	
1	and the local distriction of the local distric	Refevant to claim No.
Y	KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism"  ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA.  vol. 44, no. 2, 1995, pages 111-7, XP002096353  See abstract and discussion	1-4,9-22
	EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30 October 1996 see the whole document	1-4,9-22
	EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4 October 1989 see the whole document	1
	EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3 May 1989 see page 3, line 50 - page 5	1
1		
		1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

in. ational Application No PCT/EP 98/05738

Patent document cited in search report		Publication date	i	Patent ramily member(s)	Publication date
WO 9600298	A	04-01-1996	AU BR CA CZ EP JP	2924695 A 9508101 A 2193101 A 9603819 A 0769068 A 10501976 T	19-01-1996 30-12-1997 04-01-1996 15-04-1998 23-04-1997 24-02-1998
EP 0739988	Α	30-10-1996	OE JP	19515891 A 9107998 A	31-10-1996 28-04-1997
EP 0335633	А	04-10-1989	AT DE DE JP US	122103 T 68922428 D 68922428 T 2150300 A 5658726 A	15-05-1995 08-06-1995 25-01-1996 08-06-1990 19-08-1997
EP 0314294	A	03-05-1989	US AT AU DE DE DK FI JP	5089386 A 110419 T 2213488 A 3851200 D 3851200 T 503888 A 884164 A 1304899 A	18-02-1992 15-09-1994 16-03-1989 29-09-1994 23-03-1995 13-03-1989 12-03-1989 08-12-1989

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

in ationales Aktenzeichen PCT/EP 98/05738

		PCT/E	P 98/05738					
a. klassifizierung des anmeldungsgegenstandes IPK 6 C1201/68								
	11 K O 01 LQ1/00							
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK								
	ACHIERTE GEBIETE	Sinkation and der is it						
Recheronierter Mindestprufstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )								
IPK 6 C12Q								
Respectively after picht zum Mindestprijfstoff geborende Vereffentlicht innen seuten diese unter der								
Recherchierte aber nicht zum Mindestprufstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen								
Wahrend de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	ame der Datenbank- und evti, verwe	endete Suchbegriffe)					
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	dor in Retracht kammanden Tode	Betr. Anspruch Nr.					
Kategorie	Dezalchinding der Veronermichung, sower entrigenicht unter Angabe	der in Bendcht kommenden Felle	Bell, Anspiden M.					
Y	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ;J		1-4,9-22					
	GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE): HEU H) 4. Januar 1996	VERSWYN						
	siehe Seite 40, Zeile 3 - Seite 4	1, Zeile						
	3; Ansprüche 28-30							
Y	ZHU Q ET AL: "Detection of Salmo	nella	1-4,9-22					
	typhi by polymerase chain reaction"							
	JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 80, 1966, Seiten 244-51, XPOO	2096352						
	siehe das ganze Dokument							
		/						
	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentfamili	ie					
	k Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ntlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert.	oder dem Prioritätsdatum veröf	ach dem internationalen Anmeldedatum Tentlicht worden list und mit der					
aber n	icht als besonders bedeutsam anzusehen ist Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen		dern nur zum. Verstandnis des der Prinzips oder der ihr zugrundellegenden					
Anmei	dedatum varaffantlicht worden ist	"X" Veröffentlichung von besondere	er Bedeutung; die beanspruchte Erfindung röffentlichung nicht als neu oder auf					
schein andere	en zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer en im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden	erfinderischer Tätigkeit beruhe						
ausget	let die aus einem undorch besonderen di und ungegeben ist (wie	kann nicht als auf erfinderische werden, wenn die Veröffentlich	er Tätigkeit beruhend betrachtet lung mit einer oder mehreren anderen					
eine B "P" Veröffe:	enutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht ntlichung, die vor dem internationalen. Anmeldedatum, aber nach	diese Verbindung für einen Fa	_					
dem b	eanspruchten Prioritätsdatum veroffentlicht worden ist Abschlusses der internationalen Recherche	"&" Veröffentlichung, die Mitglied de Absendedatum des internation						
			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·					
1	2. März 1999	29/03/1999						
Name und F	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Bediensteter						
	Nt 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Osborne, H						
1	· wa. (TO: 10) OTO OOTO	1						

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inc. liationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/05738

Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism" ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA, Bd. 44, Nr. 2, 1995, Seiten 111-7. XP002096353 siehe Zusammenfassung und Diskussion	1-4,9-22
EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument	1-4,9-22
EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4. Oktober 1989 siehe das ganze Dokument	1
EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3. Mai 1989 siehe Seite 3, Zeile 50 - Seite 5	1
	KUR J ET AL: "Identification of Pseudomonas aeruginosa on the basis of polymerase chain reaction amplified DNA spacer polymorphism" ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA, Bd. 44, Nr. 2, 1995, Seiten 111-7. XP002096353 siehe Zusammenfassung und Diskussion  EP 0 739 988 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 30. Oktober 1996 siehe das ganze Dokument  EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4. Oktober 1989 siehe das ganze Dokument  EP 0 314 294 A (GENE TRAK SYSTEMS) 3. Mai 1989

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veroffentlichungen, die zur seiben Patentfamilie gehoren

im Recherchenbe			e genoren	i i	Tri duonains Aug.	
angeführtes Patentoc WO 9600298	Pricht Okument A	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum dos	_
	^	04-01-1996	AI BI CA CZ	2924699 R 9508101 2193101	5 A 19-01-1996 1 A 30-12-1997	
EP 0739988	Α	30-10-1996	EP JP DE	0769068 10501976 19515891	T 23-04-1998 T 23-04-1997 24-02-1998	
EP 0335633	Α	04-10-1989	AT DE	9107998 	A 28-04-1997 T 15-05-1995	
EP 0314294	 А	03-05-1989	DE JP US 	08922428 T 2150300 A 5658726 A	08-06-1995 25-01-1996	
			AT AU DE DE DK FI	5089386 A 110419 T 2213488 A 3851200 D 3851200 T 503888 A 884164 A 1304899 A	18-02-1992 15-09-1994 16-03-1989 29-09-1994 23-03-1995 13-03-1989 12-03-1989 08-12-1989	

## PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/12949 **A2** C07H 21/00 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. März 1999 (18.03.99)

PCT/EP98/05738 (21) Internationales Aktenzeichen:

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. September 1998 (09.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 39 611.9

9. September 1997 (09.09.97)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTE-CON GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND CONSULTING MBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).

(72) Erfinder: und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGHOF, Kornelia [DE/DE]; Rhodeländerweg 85, D-12355 Berlin (DE). GASCH, Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, D-13359 Berlin (DE). BRÄUER, Anja [DE/DE]; Residenzstrasse 100, D-13409 Berlin (DE). GRÖNEWALD, Cordt [DE/DE]; Elberfelder Strasse 12, D-10555 Berlin (DE), WILBORN, Freimut [DE/DE]; Neue Kantstrasse 9, D-14057 Berlin (DE). ROLFS, Arndt [DE/DE]; Schröderstrasse 39, D-18055 Rostock (DE).
- (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC. LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ. TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: AMINO ACID SEQUENCES AND METHOD FOR ISOLATING BACTERIES FROM THE TYPE GENUS PSEUDOMONAS'
- (54) Bezeichnung: NUCLEINSÄURE-SEQUENZEN UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON BAKTERIEN DER GATTUNG **PSEUDOMONAS**
- (57) Abstract

The invention relates to one or more nucleic acid molecule and a method for isolating bacteries from the type genus pseudomonas, especially pseudomonas aeruginosa. It also relates to a test kit for implementing said method.

#### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nucleinsäuremolekül bzw. -moleküle sowie ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere Pseudomonas aeruginosa. Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Testkit bzw. Testkits zur Durchführung der genannten Nachweisverfahren.

## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

		<b>T</b> 30	Caraina	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AL	Albanien	ES	Spanien	LT	Litauen	SK	Slowakei
AM	Armenien	FI	Finnland	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AT	Österreich	FR	Frankreich	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑU	Australien	GA	Gabun		Monaco	TD	Tschad
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Republik Moldau	TG	Togo
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	•	TJ	Tadschikistan
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TM	Turkmenistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TR	Türkei
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TT	Trinidad und Tobago
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali		Ukraine
ВJ	Benin	ΙE	Irland	MN	Mongolei	UA	•
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	Lī	Liechtenstein	SD	Sudan		
DК	Dănemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Nucleinsäure-Sequenzen und Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas

Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle für *Pseudomonas*-Nachweis, einen Kit sowie deren Verwendungen.

## Allgemeiner Hintergrund der Erfindung

Das gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist ein weit-verbreitetes, für den Menschen pathogenes Bakterium, das vor allem für Neugeborene und abwehrgeschwächte Menschen ein hohes gesundheitliches Risiko darstellt. Neben seiner hohen klinischen Relevanz, der häufig vorhandenen Antibiotikaresistenzen und der Bildung von Toxinen, insbesondere des hochgiftigen Exotoxins A (Woods, D.E. and Iglewski, B.H., Rev. Infect. Dis. 5, 714-722 (1983), ist *Pseudomonas aeruginosa* einer der bedeutendsten, bakteriellen Verursacher von Lebensmittelvergiftungen. Für den Nachweis von

Pseudomonas aeruginosa werden mittels konventioneller Verfahren mindestens 4 Tage benötigt. Die Entwicklung schneller Nachweisverfahren von Pseudomonas aeruginosa in Lebensmitteln und klinischen Proben ist daher dringend erforderlich.

Für den routinemäßigen Einsatz zur Erfassung einzelner Mikroorganismen sind in den letzten Jahren eine Reihe neuer Methoden entwickelt worden. Hierzu zählen immunologische Verfahren, die auf dem Einsatz polyvalenter oder monoklonaler Antikörper beruhen und Verfahren, bei denen Nucleinsäure-Sonden zum Nachweis mittels Hybridisierung an keimspezifische Nucleinsäuren eingesetzt werden. Als weitere Methoden werden diejenigen Verfahren beschrieben, die auf einer spezifischen Nucleinsäure-Amplifikation basieren, mit oder ohne anschließende Bestätigungsreaktion durch Nucleinsäure-Hybridisierung. Eingesetzte Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren sind z.B. die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) [US Fatente 4,683,195; 4,683,202; und 4,965,188], die Ligase-Kettenreaktion [WO Veröffentlichung 89/09835], die "self-sustained sequence replication" [EP 329,822], das "transcription based amplification system" [EP 310,229] und das Q $\beta$  RNA-Replikase-System [US Patent 4,957,858].

Die genannten Verfahren auf Nucleinsäure-Basis sind so sensitiv, daß, anders als bei konventionellen mikrobiologischen Verfahren, eine langwierige Anreicherung des nachzuweisenden Mikroorganismus aus der zu untersuchenden Probe entfällt oder stark verkürzt werden kann. Eine Untersuchung auf An- oder Abwesenheit des jeweiligen Mikroorganismus ist daher bei Anwendung der genannten Verfahren auf Nucleinsäure-Basis in der Regel innerhalb eines Tages abgaschlossen. Insbesondere wenn für den Nachweis mittels konventioneller Verfahren mehrere Tage bis Wochen

benötigt werden, wird hierdurch eine erhebliche Zeitverkürzung erreicht.

Es sind verschiedene Verfahren auf PCR-Basis zum Nachweis von Pseudomonas aeruginosa beschrieben. Mittels Amplifikation einer 369 bp langen DNA-Region aus dem Exotoxin A-Gen konnte selektiv die Anwesenheit von Stämmen der Spezies Pseudomonas aeruginosa nachgewiesen werden [Khan et al. (1994), Appl. Environ. Microbiol. 60, 3739-3745]. Zwar wurden mit diesem PCR-System keine Bakterien anderer Spezies erfaßt, jedoch konnte nur bei 96% der insgesamt 130 getesteten Pseudomonas aeruginosa-Stämme ein Amplifikat beobachtet werden. Dieses PCR-System ist somit nur bedingt für die Etablierung eines Schnellverfahrens geeignet, mit dem die Anwesenheit aller Stämme von Pseudomonas aeruginosa zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Mit Hilfe eines weiteren, kürzlich veröffentlichten, auf einer Multiplex-PCR basierenden Verfahrens gelang der selektive Nachweis von fluoreszierenden Pseudomonaden einerseits und Pseudomonas aeruginosa andererseits [De Vos et al (1997), J. Clin. Microbiol. 35, 1295-1299]. Jedes der insgesamt 150 getesteten Isolate von Pseudomonas aeruginosa konnte mit diesem Verfahren erfaßt werden. Nachteilig ist jedoch, daß das für die selektive Erfassung von Pseudomonas aeruginosa herangezogene oprL-Gen auch in anderen Spezies der Gattung Pseudomonas hochkonserviert ist. So sind die Aminosäuren, die im Bereich der Bindungsstellen der von Voss et al. verwendeten Primer kodiert werden, in Pseudomonas putida und Pseudomonas aeruginosa identisch. Der Nachweis von Pseudomonas aeruginosa beruht somit lediglich auf einigen wenigen unterschiedlichen Basenpaaren bedingt durch die Variation der dritten Position einzelner Aminosäurecodons. Dies birgt erfahrungsgemäß eine große Gefahr des Auftretens von falsch-positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen.

Das beschriebene Multiplex-PCR-System bietet zudem wegen der hohen Konservierung der oprI und oprL-Gene wohl kaum die Möglichkeit, durch z.B. Einsatz verschiedener Sonden im Anschluß an die PCR-Reaktion, auch andere klinisch relevante Spezies der Gattung Pseudomonas nachzuweisen, wie z.B. Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas putida oder Pseudomonas stutzeri.

Ziel der hier dargestellten Erfindung war die Etablierung von Nucleinsäuresequenzen, deren Einsatz als Primer und/oder Sonden eine möglichst vollständige Erfassung aller Vertreter der Spezies Pseudomonas aeruginosa sicherstellt. Ein weiteres Ziel der Erfindung war das Auffinden eines Genom-Bereiches, der innerhalb verschiedener Spezies der Gattung Pseudomonas ausreichend hohe Sequenz-Variabilität aufweist, um optional auch den Nachweis anderer Spezies der Gattung Pseudomonas zu ermöglichen, z.B. durch Einsatz verschiedener Varianten von Primern und/oder Sonden in der PCR bzw. im Anschluß an die PCR.

Je nach Größe der zu detektierenden Gruppe von Mikroorganismen und evolutionäre Verwandtschaft (Ähnlichkeit) von abzugrenzenden (nicht zu erfassenden) Mikroorganismen erfordert ein auf differentiellen DNA-Sequenzen basierender Nachweis sehr umfangreiche Vorarbeiten, um jeweils geeignete DNA-Sequenzen mit der gewünschten Spezifität zu finden. Die hier dargelegte Erfindung betrifft solche DNA-Sequenzen, mit denen der Schnellnachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere von Pseudomonas aeruginosa möglich ist.

## Beschreibung der Erfindung

Gemäß einer Ausführungsform will die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst, das dadurch gewinnbar ist, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einerseits einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nichtnachzuweisenden Bakterien angehören,

- (a) in an sich bekannter Weise aus einem Fseudomonas-Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt /erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,.... und oder nten Fseudomonas-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas von der nicht-nach-zuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

Das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann dadurch gewinnbar sein, daß man von Stämmen ausgeht, die einerseits nachzuweisenden Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht nachzuweisenden Bakterien eines anderen

Genus (anderer Genera) als Pseudomonas angehören.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch ein Nucleinsäuremolekül gelöst, das dadurch gewinnbar ist, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden und einer nichtnachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas angehören,

- (a) in an sich bekannter Weise aus einem *Fseudomonas-*Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrentenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,.... und/oder nten Pseudomonas-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* von der nicht-nach-zuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

Das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül kann dadurch gewinnbar sein, daß man von Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien der Species *Pseudomonas aeruginosa* und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien anderer Species angehören.

Ferner betrifft die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.

Ferner betrifft die Erfindung ein derartiges Nucleinsäuremolekül mit einer gegenüber dem vorstehenden Nucleinsäuremolekül verkürzten Sequenz, und zwar der Sequenz des Bereiches oder im Bereich der Nukleptidpositionen 12 bis 131.

Ferner betrifft die Erfindung ein derartiges Nucleinsäuremolekül mit einer gegenüber einem Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 1 verkürzten Sequenz, nämlich

- (i) der SEQ ID NO 3 oder
- (ii) der SEQ ID NO 4 oder
- (iii) der SEQ ID NO 5 oder
- (iv) der zu (i), (ii) und (iii) jeweils komplementären Sequenz.

Ferner betrifft die Erfindung ein Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 2 oder der hierzu komplementären Sequenz.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette

- (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
- (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem

- Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist.

Ein derartiges erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es 10 bis 250 und vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.

Ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es

- (i) als DNA oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA oder
- (iii) als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

So kann ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert sein, daß bis zu 20 % der Nukleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.

Ferner kann das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert sein, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch einen Kit für analytische Nachweisverfahren gelöst, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, wobei der Kit gekennzeichnet ist durch ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch eine Verwendung von einem oder mehreren erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen oder eines erfindungsgemäßen Kits zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien gelöst, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* angehören.

Die erfindungsgemäße Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt oder durch diese Stämme gebildet wird.

Eine derartige erfindungsgemäße Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* ausschließlich um *Pseudomonas* aeruginosa-Stämme handelt.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nichtnachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer
Nukleotidposition im Bereich eines erfindungsgemäßen
Nucleinsäuremoleküls unterscheidet.

Ferner kann eine erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet sein, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz unterscheidet.

Zur Detektion von spezifischen Mikroorganismen mittels
Nucleinsäure-Hybridisierung oder -Amplifikation werden
erfindungsgemäß also keimspezifische Oligonukleotide
eingesetzt. Keimspezifische Oligonukleotide sind
Nucleinsäuren, 10 bis 250 Basen (vorzugsweise 15 bis 30
Basen) lang, deren Basensequenz charakteristisch für einen
spezifischen Mikroorganismus oder eine Gruppe von
Mikroorganismen ist. Eine Hybridisierung an DNA bzw. eine
Amplifikation von DNA bei Einsatz dieser keimspezifischen
Oligonukleotide (z.B. als Primer oder Sonden) mit den oben
genannten Verfahren kann, unter geeigneten
Reaktionsbedingungen, nur dann erfolgen, wenn die DNA der
jeweils nachzuweisenden Mikroorganismen anwesend ist.

Prokaryontische Ribosomen beinhalten drei distinkte Nucleinsäurekomponenten, welche allgemein als 5S, 16S und 23S rRNA (ribosomale Ribonucleinsäure) bekannt sind. Die genetische Information für diese Ribonucleinsäuren (rDNA) ist im Genom typischerweise in Form von Tandems angeordnet. Die Organisation einer solchen Einheit ist 16S-23S-5S, wobei die drei Gene durch kurze hypervariable intergenische Regionen voneinander getrennt sind. Die Einheiten sind im Genom mehrfach vorhanden, wobei die Anzahl der sich wiederholenden Einheiten in verschiedenen Bakterien variieren kann. Die hohe Konservierung der DNA-Sequenz im Bereich der 16S rDNA, der 23S rDNA und der 5S rDNA über das gesamte Bakterienreich ermöglicht ein Design von nicht-spezifischen Oligonukleotiden auch ohne genaue Kenntnis der DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Mikroorganismen. Solche nicht-spezifischen Oligonukleotide sind charakteristisch für eine größere, in der Regel phylogenetisch verwandte Gruppe von Mikroorganismen. Durch Einsatz dieser nicht-spezifischen Oligonukleotide gelingt dem Fachmann, z.B. nach entsprechenden Vorversuchen durch DNA-Amplifikation mittels PCR, die Isolation von rDNA-Fragmenten, z.B. der 23S/5S intergenischen Region eines beliebigen Mikroorganismus. Durch DNA-Sequenzierung kann dann die Sequenz der hypervariablen intergenischen Regionen des betreffenden Mikroorganismus bestimmt werden.

DNA-Sequenzierung der 23S/5S intergenischen Region einer möglichst großen Anzahl nachzuweisender Bakterien (z.B von verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies) einerseits und nachfolgender Vergleich dieser DNA-Sequenzen andererseits erlauben das Auffinden von DNA-Bereichen, die in der untersuchten Gruppe (z.B. alle *Pseudomonas*-Spezies) nicht oder nur unwesentlich verändert ist.

DNA-Sequenzierung der 23S/5S intergenischen Region ausgewählter nicht-nachzuweisender Bakterien (z.B. Bakterien die nicht zur Gattung Pseudomonas gehören) einerseits und nachfolgender Vergleich dieser DNA-Sequenzen mit der Sequenz der nachzuweisenden Bakterien (z.B. verschiedener Pseudomonas-Spezies) andererseits erlaubt das Auffinden von DNA-Sequenzen, die für die nachzuweisenden Bakterien (z.E. alle Pseudomonas-Spezies) charakteristisch sind. Aus diesen DNA-Sequenzen können wiederum Oligonukleotide abgeleitetet werden, die als Primer und/oder Sonden in auf Nucleinsäuren basierenden Verfahren einsetzbar sind, mit dem Ziel, die jeweilige Gruppe von Bakterien (z.B. alle Spezies der Gattung Pseudomonas) spezifisch nachzuweisen.

Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen DNA-Sequenzen zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas, insbesondere Bakterien der Spezies Pseudomonas aeruginosa, basieren auf der 23S/5S intergenischen Region und dem direkt angrenzenden Bereich der 23S rDNA. Die DNA-Sequenz in dieser Region wurde für eine Vielzahl von Bakterien bestimmt. Nach exakten Sequenzvergleichen wurden keimspezifische Nucleinsäuresequenzen bestimmt, für Primer und/oder Sonden für einen Einsatz in einem Spezies-/Genus-spezifischen Nachweisverfahren benutzt werden können.

Zum Nachweis der jeweiligen Gruppe von Mikroorganismen werden Nucleinsäuren, vorzugsweise genomische DNA, zunächst aus den in einer zu untersuchenden Probe bzw. Bakterienkultur enthaltenen Zellen freigesetzt. Mittels Nucleinsäurehybridisierung kann dann, und zwar unter Einsatz der erfindungsgemäßen keimspezifischen Oligonukleotide als Sonde, der direkte Nachweis von keimspezifischen Nucleinsäuresequenzen in der zu untersuchenden Probe erfolgen. Geeignet hierzu sind verschiedene dem Fachmann bekannte Verfahren, wie z.B. "Southern blot" oder "dot blot".

Bevorzugt ist jedoch, vor allem wegen der höheren Empfindlichkeit, ein indirektes Nachweisverfahren, bei dem die gesuchten DNA/RNA-Sequenzen zunächst mittels der o.g. Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren, vorzugsweise PCR, amplifiziert werden.

Die Amplifikation von DNA/RNA unter Verwendung der genannten Verfahren kann unter Einsatz von keimspezifischen Oligonukleotiden als Primer erfolgen. Dabei werden nur in dem Fall spezifische Amplifikate gebildet, in dem DNA/RNA des nachzuweisenden Mikroorganismus anwesend ist. Durch eine nachgeschaltete Detektionsreaktion unter Verwendung von keimspezifischen Oligonukleotiden als Sonden kann die Spezifität des Nachweisverfahrens erhönt werden. Für diese nachgeschaltete Detektionsreaktion ist ebenso die Verwendung von nicht-keimspezifischen Oligonukleotiden möglich.

Alternativ kann die Nucleinsäure-Amplifikation auch in Anwesenheit eines oder mehrerer nicht-spezifischer Oligonukleotide durchgeführt werden, so daß möglicherweise auch DNA/RNA anderer, nicht-nachzuweisender Mikroorganismen amplifiziert werden kann. Ein derartiges

Amplifikationsverfahren ist in der Regel weniger spezifisch und sollte daher durch eine nachfolgende Detektionsreaktion mit einem oder mehreren keimspezifischen Oligonukleotid(en) als Sonde(n) abgesichert werden.

Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren bekannt, mit denen die bei den indirekten Verfahren entstehenden Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden können. Dazu gehören u.a. die Visualisierung mittels Gelelektrophorese, die Hybridisierung von Sonden an immobilisierte Reaktionsprodukte (gekoppelt an Nylon- oder Nitrocellulose-Filter ("Southern blots") oder z.B. an "beads" oder Mikrotiterplatten) und die

Hybridisierung der Reaktionsprodukte an immobilisierte Sonden (z.E. "reverse dot blots" oder mit Sonden gekoppelte "beads" oder Mikrotiterplatten).

Es sind eine Vielzahl verschiedener Varlanten beschrieben, mit denen keimspezifische Oligonukleotide (z.E. Sonden und Primer) für die beschriebenen direkten oder indirekten Nachweisverfahren markiert bzw. modifiziert werden können. So können diese beispielsweise radioaktive, farbige, fluoreszierende oder anderweitig modificierte bzw. modifizierende Gruppen enthalten, beispielsweise Antikörper, Antigene, Enzyme bzw. andere Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen. Sonden bzw. Frimer können entweder natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte doppelsträngige oder einzelsträngige DNA oder RNA sein bzw. modifizierte Formen von DNA oder RNA, wie z.B. PNA (bei diesen Molekülen sind die Zucker-Einheiten durch Aminosäuren oder Peptide ausgetauscht). Einzelne oder mehrere Nukleotide der Sonden oder Primer können gegen analoge Bausteine (wie z.B. Nukleotide, die in der Ziel-Nucleinsäure nicht natürlich vorkommen) ersetzt sein. Bei den o.g. indirekten Nachweisverfahren kann Detektion auch über ein internmarkiertes Amplifikat geführt werden. Dies kann z.B. über den Einbau von modifizierten (z.B. an Digoxigenin oder an Fluorescein gekoppelten) Nukleosidtriphosphaten während der Amplifikationsreaktion erfolgen.

Geeignet als erfindungsgemäße keimspezifische Oligonukleotide sind Nucleinsäuren, vorzugsweise 10 bis 250 Basen und insbesondere 15 bis 30 Basen lang, die mindestens in einer 10 Basen langen Sequenz mit den unten angegebenen Sequenzen 1 bis 5 oder den hierzu komplementären Sequenzen übereinstimmen. Geringere Abweichungen (1 bis 2 Basen) in dieser 10 Basen langen Sequenz sind möglich, ohne daß die jeweils angegebene Spezifität bei der Amplifikation und/oder Hybridisierung

verloren geht. Dem Fachmann ist bekannt, daß im Falle solcher geringeren Abweichungen die Reaktionsbedingungen entsprechend verändert werden müssen; vgl. beispielsweise T. Maniatis, Molecular Cloning, Herausgeber G. Sambrook & E.F. Fritsch, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

Die Sequenz von *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) im Bereich der 23S/5S intergenischen Region lautet:

(Sequenz 1 = SEQ ID NO 1))

ATAACACCCAAACATCTGAYGATTGTGTGTTGTAAGGTGAAGTCGACGAACCGAAAGTTCG CATGAACCGCAAACACCTTGAAATCACATACCTGAATCCGGATAGACGTAAGCCCAAGCGAA CGGATAT

Außerdem wurde die Sequenz im Bereich der 23S/5Sintergenischen Region für 6 weitere Stämme der Spezies

Pseudomonas aeruginosa sowie für mindestens je einen Stamm der folgenden Spezies bestimmt: Pseudomonas asplenii, Pseudomonas citronellosis, Pseudomonas corrugata, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas fragi, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas pseudoalcaligenes, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas syringae. Die Sequenzvergleiche ergaben, daß sich mehrere, von Sequenz 1 abgeleitete Oligonukleotide für den selektiven Nachweis von Bakterien der Spezies Pseudomonas aeruginosa eignen. Geeignet für solche keimspezifischen Oligonukleotide ist die Sequenz der Region (12-131).

Von Sequenz 1 wurden folgende, als Primer für die PCR (Sequenz 3 und 5) und als Sonde (Sequenz 4), besonders geeignete Oligonukleotide abgeleitet.

Oligonukleotid Pal (Sequenz 2) entspricht Position 2823-2842 eines 23S rRNA-Gens von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 [Toschka et al. (1987), Nucleic Acids. Res. 15, 7182]:

Oligonukleotid Pa1: (Sequenz 2 = SEQ ID NO 2) 5'GATAGGCTGGGTGTAAGC-3'
Oligonukleotid Pa2: (Sequenz 3 = SEQ ID NO 3) 5'CTTGGGCTTACGTCTATCCG-3'
Oligonukleotid Pa3: (Sequenz 4 = SEQ ID NO 4) 5'-TTCAGGTATG
TGATTTCAAG GTG-3'
Oligonukleotid Pa4: (Sequenz 5 = SEQ ID NO 5) 5'GACGATTGTGTGTGTAAGGTGA

Beispiel 1: Nachweis von Bakterien der Spezies *Pseudomonas* aeruginosa mit der Polymerase-Kettenreaktion

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde DNA mittels Standardverfahren isoliert. Je ca. 10 bis 100 ng dieser DNA-Präparationen wurde dann in Gegenwart von je 0,4  $\mu$ M Oligonukleotid Pa1 und Pa2 oder Pa4 und Pa2, 200  $\mu$ M dNTP's (Boehringer Mannheim), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,01 % Tween 20 und 0,03 U/ $\mu$ l Taq-Polymerase (Biomaster) in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer 9600 (Pa1 und Pa2)/ Biometra TRIO-Thermoblock (Pa4 und Pa2) Thermocycler mit den nachfolgend aufgeführten Thermoprofilen durchgeführt:

## a) Amplifikation mit Oligonukleotid Pal und Pa2

-	initiale Denaturierung	95	°C	5	min
-	1. Amplifikation (15 Zyklen)	94	°C	35	sek
		68	°C	30	sek
		72	°C	30	sek
_	2. Amplifikation (20 Zyklen)	94	°C	35	sek
		64	°C	30	sek
		72	°C	30	sek

- finale Synthese	72 °C	5 min
b) Amplifikation mit Oligonukleotid Pa	a4 und Pa2	
- initiale Denaturierung	95 °C	5 min
- Amplifikation (35 Zyklen)	95 °C €2 °C 72 °C	30 sek 30 sek 20 sek
- finale Synthese	72 °C	5 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid visualisiert. Die erwarteten Produkte von 191 bp /102 bp Länge wurden nur in den Fällen beobachtetet, in denen DNA von Stämmen der Spezies Pseudomonas aeruginosa anwesend war (vergleiche Tabelle 1), nicht aber bei Anwesenheit von DNA der anderen getesteten Bakterien. Nach Beendigung des Laufes wurde die in den Gelen enthaltene DNA mittels Standard-Methoden auf Nylon-Filter transferiert und zur Überprüfung der Spezifität mit dem am 5'-Ende biotinylierten Oligonukleotid Pa3 (Sequenz 4) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5 x SSC , 2 %Blocking Reagenz, 0,1 % Laurylsarcosin, 0,02 % SDS und 5 pmol/ml Sonde für 4 h bei 48°C. Gewaschen wurde in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 2 x 5 min bei Raumtemperatur und in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 1 x 15 min bei 48°C. Die Detektion erfolgte nach Standard-Methoden mittels Alkalischer Phosphatase-Konjugate (Extravidin, Fa SIGMA, # E-2636) in Anwesenheit von 5-Bromo-4chloro-3-indolylphosphat und 4-Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (Fa. Boehringer Mannheim).

Auf den Filtern wurde nur in den Fällen eine Bande beobachtet, in denen zuvor auch eine Bande auf dem Agarose-Gel sichtbar war (siehe Tabelle 1). Somit wurde mittels PCR und mittels Hybridisierung die Anwesenheit sämtlicher der 86 getesteten Pseudomonas aeruginosa-Stämme nachgewiesen. Hingegen wurde keiner der getesteten nicht zu dieser Spezies gehörenden Bakterienstämme mit diesem System erfaßt.

Tabelle 1: Resultate der PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden Pal/Pa2 (SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 3) und Pa4/Pa2 (SEQ ID NO 5 und SEQ ID NO 3) und nachfolgender Hybridisierung mit dem Oligonukleotid Pa3 (SEQ ID NO 4).

Spezies	Stammbezeichnung	Pa1/Pa2	Pa4/Pa2
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 10145	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 14886	+	1+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15522	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15691	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15692	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 21472	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 21776	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 33350	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 33361	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 33818	+	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 33988	+	+
Pseudomonas aeruginosa	LMG 8029	+	+
Pseudomonas aeruginosa	DSM 288	+	+
Pseudomonas aeruginosa	DSM 939	+	+
Pseudomonas aeruginosa	DSM 1117	+	+
Pseudomonas aeruginosa	DSM 1253	+	+
Pseudomonas aeruginosa	DSM 1299	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 682	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 4283	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 4880	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 4937	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 4938	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5258	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5594	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5595	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5596	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5597	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5598	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5599	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5600	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5601	+	+

La	1		,
Pseudomonas aeruginosa	BC 5602	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5603	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5604	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5606	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5607	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5917	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5918	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5919	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5920	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5921	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5922	4	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5923	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5924	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5925	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5926	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5927	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5928	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5929	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5930	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5932	4	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5933	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 5934	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7046	1+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7047	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7048	1+	1+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7049	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7050	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7051	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7052	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7053	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7054	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7055	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7056	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7057	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7058	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7059	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7060	<del> </del>	j
Pseudomonas aeruginosa	BC 7061	+	1+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7062	+	+
Pseudomonas aeruginosa		+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7063 BC 7064	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7065	+	+
Pseudomonas aeruginosa		+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7066	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7067	+	+
	BC 7068	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7069	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7070	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7071	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7072	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7073	+	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7474	n.d.	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 7475	n.d.	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 8468	n.d.	+
Pseudomonas aeruginosa	BC 8493	n.d.	+

Pseudomonas alcaligenes   DSM 50342   -   -   -				
Pseudomonas cepacia   BC 3134     -	Pseudomonas alcaligenes	DSM 50342	-	-
Pseudomonas chlororaphis   BC 1753   -   -   -	Pseudomonas asplenii	DSM 50254	-	_
Pseudomonas citronellosis   DSM 50332   -   -   -	Pseudomonas cepacia	BC 3134	-	-
Pseudomonas   Corrugata   DSM 7228   -	Pseudomonas chlororaphis	BC 1753	_	_
Pseudomonas fluorescens         BC 950         n.d.         -           Pseudomonas fluorescens         BC 4882         -         -           Pseudomonas fluorescens         BC 2439         -         -           Pseudomonas fragi         DSM 3456         -         -           Pseudomonas indigofera         BC 1105         n.d.         -           Pseudomonas mendocina         DSM 50017         -         -           Pseudomonas mendocina         DSM 50017         -         -           Pseudomonas plockettii         BC 3323         -         -           Pseudomonas pickettii         BC 3323         -         -           Pseudomonas putida         DSM 50188         -         -           Pseudomonas putida         DSM 50188         -         -           Pseudomonas putida         DSM 548         -         -           Pseudomonas putida         DSM 548         -         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas sutida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas sutida         DSM 490         -         -	Pseudomonas citronellosis	DSM 50332	_	_
Pseudomonas fluorescens BC 4882		DSM 7228	-	
Pseudomonas fluorescens         BC 2439         -         -           Pseudomonas fragi         DSM 3456         -         -           Pseudomonas indigofera         BC 1105         n.d.         -           Pseudomonas mendocina         DSM 50017         -         -           Pseudomonas mendocina         DSM 50017         -         -           Pseudomonas plesendomonas plesendomonas plesendomonas plesendomonas plesendomonas plesendomonas plesendomonas putida         DSM 50188         -         -           Pseudomonas putida         DSM 291         -         -         -           Pseudomonas putida         DSM 548         -         -         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -         -           Pseudomonas putida         ATCC 950         -         -         -           Citrobacter amalonaticus         DSM 4593         -	Pseudomonas fluorescens	BC 950	n.d.	_
Pseudomonas fragi         DSM 3456         -         -           Pseudomonas indigofera         BC 1105         n.d.         -           Pseudomonas mendocina         DSM 50017         -         -           Pseudomonas oleovorans         DSM 1045         -         -           Pseudomonas pickettii         BC 3323         -         -           Pseudomonas pickettii         BC 3323         -         -           Pseudomonas pickettii         BC 3323         -         -           Pseudomonas pickettii         BC 4941         -         -           Pseudomonas putida         DSM 548         -         -           Pseudomonas putida         DSM 548         -         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas sutida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas sutida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas sutida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas sutida         DSM 549         n.d.         - <td>Pseudomonas fluorescens</td> <td>BC 4882</td> <td>_</td> <td>-</td>	Pseudomonas fluorescens	BC 4882	_	-
Pseudomonas indigofera         BC 1105         n.d.	Pseudomonas fluorescens	BC 2439	_	-
Pseudomonas mendocina   DSM 50017   -	Pseudomonas fragi	DSM 3456	-	_
Pseudomonas oleovorans         DSM 1045         -         -           Pseudomonas pickettii         BC 3323         -         -           Pseudomonas putida         DSM 50188         -         -           Pseudomonas putida         DSM 291         -         -           Pseudomonas putida         DSM 548         -         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas putida (ovalis)         ATCC 950         -         -           Pseudomonas stutzeri         BC 4940         -         -           Pseudomonas svringae         DSM 10604         -         -           Pseudomonas svringae         DSM 4593         -         n.d.           Enterobacter amalonaticus         DSM 30053         -         n.d.           Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         - </td <td>Pseudomonas indigofera</td> <td>BC 1105</td> <td>n.d.</td> <td>-</td>	Pseudomonas indigofera	BC 1105	n.d.	-
Pseudomonas         DSM 50188         -         -           Pseudomonas         DSM 50188         -         -           Pseudomonas putida         BC 4941         -         -           Pseudomonas putida         DSM 291         -         -           Pseudomonas putida         DSM 548         -         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas putida         ATCC 950         -         -           Pseudomonas stutzeri         BC 4940         -         -           Pseudomonas syringae         DSM 10604         -         -           Citrobacter amalonaticus         DSM 4593         -         n.d.           Enterobacter aerogenes         DSM 30053         -         n.d.           Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.	Pseudomonas mendocina	DSM 50017	-	
Pseudomonas         DSM 50188         -         -           Pseudomonas putida         BC 4941         -         -           Pseudomonas putida         DSM 291         -         -           Pseudomonas putida         DSM 548         -         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas putida         ATCC 950         -         -           (ovalis)         Pseudomonas stutzeri         BC 4940         -         -           Pseudomonas syringae         DSM 10604         -         -           Citrobacter amalonaticus         DSM 4593         -         n.d.           Enterobacter aerogenes         DSM 30053         -         n.d.           Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.	Pseudomonas oleovorans	DSM 1045	1-	
Pseudomonas putida BC 4941	Pseudomonas pickettii	BC 3323	-	
Pseudomonas putida         BC 4941	Pseudomonas	DSM 50188	_	-
Pseudomonas putida         DSM 291         -         -           Pseudomonas putida         DSM 548         -         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas putida         ATCC 950         -         -           (ovalis)         -         -         -           Pseudomonas stutzeri         BC 4940         -         -           Pseudomonas syringae         DSM 10604         -         -           Citrobacter amalonaticus         DSM 4593         -         n.d.           Enterobacter aerogenes         DSM 30053         -         n.d.           Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.	pseudoalcaligenes			
Pseudomonas putida         DSM 548         -         -           Pseudomonas putida         DSM 549         n.d.         -           Pseudomonas putida         ATCC 950         -         -           (ovalis)         -         -         -           Pseudomonas stutzeri         BC 4940         -         -           Pseudomonas syringae         DSM 10604         -         -           Citrobacter amalonaticus         DSM 4593         -         n.d.           Enterobacter aerogenes         DSM 30053         -         n.d.           Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.	Pseudomonas putida	BC 4941		-
Pseudomonas putida DSM 549 n.d Pseudomonas putida ATCC 950 - (ovalis) Pseudomonas stutzeri BC 4940 - Pseudomonas svringae DSM 10604 - Citrobacter amalonaticus DSM 4593 - Enterobacter aerogenes DSM 30053 - Escherichia coli ATCC 8739 - Escherichia hermanii DSM 4560 - Klebsiella pneumoniae BC 5362 - Klebsiella terrigena BC 4700 - Proteus vulgaris DSM 2024 - Providencia stuartii BC 5950 -  N.d  Provid	Pseudomonas putida	DSM 291	i –	
Pseudomonas putida (ovalis)         ATCC 950         -	Pseudomonas putida	DSM 548	-	_
(ovalis)         BC 4940         -         -           Pseudomonas stutzeri         BC 4940         -         -           Pseudomonas syringae         DSM 10604         -         -           Citrobacter amalonaticus         DSM 4593         -         n.d.           Enterobacter aerogenes         DSM 30053         -         n.d.           Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.		DSM 549	n.d.	-
Pseudomonas stutzeri         BC 4940         -         -           Pseudomonas syringae         DSM 10604         -         -           Citrobacter amalonaticus         DSM 4593         -         n.d.           Enterobacter aerogenes         DSM 30053         -         n.d.           Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.		ATCC 950		
Pseudomonas syringae         DSM 10604         -         -           Citrobacter amalonaticus         DSM 4593         -         n.d.           Enterobacter aerogenes         DSM 30053         -         n.d.           Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.	(ovalis)			
Citrobacter amalonaticus         DSM 4593         -         n.d.           Enterobacter aerogenes         DSM 30053         -         n.d.           Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.	Pseudomonas stutzeri	BC 4940	-	
Enterobacter aerogenes         DSM 30053         -         n.d.           Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.		DSM 10604	_	-
Escherichia coli         ATCC 8739         -         n.d.           Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.	Citrobacter amalonaticus	DSM 4593	-	n.d.
Escherichia hermanii         DSM 4560         -         n.d.           Klebsiella pneumoniae         BC 5362         -         n.d.           Klebsiella terrigena         BC 4700         -         n.d.           Proteus vulgaris         DSM 2024         -         n.d.           Providencia stuartii         BC 5950         -         n.d.	Enterobacter aerogenes	DSM 30053	-	n.d.
Klebsiella pneumoniae BC 5362 - n.d. Klebsiella terrigena BC 4700 - n.d. Proteus vulgaris DSM 2024 - n.d. Providencia stuartii BC 5950 - n.d.	Escherichia coli	ATCC 8739	_	n.d.
Klebsiella terrigena BC 4700 - n.d. Proteus vulgaris DSM 2024 - n.d. Providencia stuartii BC 5950 - n.d.	Escherichia hermanii	DSM 4560		n.d.
Proteus vulgarisDSM 2024-n.d.Providencia stuartiiBC 5950-n.d.	Klebsiella pneumoniae	BC 5362		n.d.
Providencia stuartii BC 5950 - n.d.	Klebsiella terrigena	BC 4700	-	n.d.
		DSM 2024	_	n.d.
Salmonella Anatum BC 2284 - n.d.		BC 5950	-	n.d.
	Salmonella Anatum	BC 2284	_	n.d.

BC: BioteCon-Stammsammlung, n.d.: nicht durchgeführt.

#### Patentansprüche

- 1. Nucleinsäuremolekül, dadurch gewinnbar, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einerseits einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht-nachzuweisenden Bakterien angehören,
- (a) in an sich bekannter Weise aus einem Stamm der genannten Bakterien (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/5S-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,.... und/oder nten Stamm der genannten Bakterien jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas von nicht-nachzuwei-senden Bakterien anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.
- 2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gewinnbar, daß man von Stämmen ausgeht, die einerseits nachzuweisenden

Bakterien des Genus *Pseudomonas* und andererseits nicht nachzuweisenden Bakterien eines anderen Genus (anderer Genera) als *Pseudomonas* angehören.

- 3. Mucleinsäuremolekül, dadurch gewinnbar, daß man von mehreren Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas angehören,
- (a) in an sich bekannter Weise aus einem Fseudomonas-Stamm dieser Gruppen (erster Stamm) genomische DNA isoliert,
- (b) in an sich bekannter Weise die 23S/53-intergenische Region gegebenenfalls mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt erstes Amplifikationsprodukt),
- (c) mit einem zweiten, dritten,.... und/oder nten Pseudomonas-Stamm dieser Gruppen jeweils gemäß Stufen (a) und (b) genomische DNA isoliert, die 23S/5S- intergenische Region mit dem direkt angrenzenden 23S-Bereich und/oder dem direkt angrenzenden 5S-Bereich amplifiziert und das Amplifikationsprodukt gewinnt (zweites, drittes, ..... ntes Amplifikationsprodukt),
- (d) in an sich bekannter Weise die DNA-Sequenz von gemäß (b) und (c) gewonnenen Amplifikationsprodukten bestimmt und die DNA-Sequenz des Amplifikationsproduktes gemäß (b) mit der DNA-Sequenz eines oder mehrerer Amplifikationsprodukte gemäß (c) vergleicht und
- (e) als Primer oder als Sonde ein Nucleinsäuremolekül in an sich bekannter Weise gewinnt, mit dessen Hilfe sich die nachzuweisende Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas von der nicht-nach-zuweisenden Gruppe von Bakterien des Genus Pseudomonas anhand von Unterschieden an mindestens einer Nukleotidposition im Sequenzbereich des Nucleinsäuremoleküls unterscheiden läßt.

- 4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 3, dadurch gewinnbar, daß man von Stämmen ausgeht, die einer nachzuweisenden Gruppe von Bakterien der Species *Pseudomonas aeruginosa* und einer nicht-nachzuweisenden Gruppe von Bakterien anderer Species angehören.
- 5. Nucleinsäuremolekül insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche der SEQ ID NO 1 oder der hierzu komplementären Sequenz.
- 6. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 5 verkürzter Sequenz, und zwar der Sequenz des Bereiches oder im Bereich der Nukleotidpositionen 12 bis 131.
- 7. Nucleinsäuremolekül mit gegenüber einem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 5 verkürzter Sequenz, nämlich
- (i) der SEQ ID NO 3 oder
- (ii) der SEQ ID NO 4 oder
- (iii) der SEQ ID NO 5 oder
- (iv) der zu (i), (ii) und (iii) jeweils komplementären Sequenz.
- 8. Nucleinsäuremolekül der SEQ ID NO 2 oder der hierzu komplementären Sequenz.
- 9. Nucleinsäuremolekül, dadurch *gekennzeichnet*, daß es hinsichtlich seiner Sequenz bei mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette
- (i) mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche identisch ist oder
- (ii) in 9 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche übereinstimmt oder
- (iii) in 8 von 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden

Ansprüche übereinstimmt oder

- (iv) zu mindestens 90 % mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche homolog ist.
- 10. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es 10 bis 250 und verzugsweise 15 bis 30 Nukleotide lang ist.
- 11. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß es einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt.
- 12. Nucleinsäuremolekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß es
- (i) als DNA oder
- (ii) als (i) entsprechende RNA oder
- (iii) als PNA vorliegt,

wobei das Nucleinsäuremolekül gegebenenfalls in einer für analytische Nachweisverfahren, insbesondere auf Basis von Hybridisierung und/oder Amplifizierung, an sich bekannten Weise modifiziert ist.

- 13. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch modifiziert ist, daß bis zu 20 % der Nukleotide von mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden seiner Nukleotidkette, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide, durch für Sonden und/oder Primer an sich bekannte analoge Bausteine ersetzt sind, insbesondere durch Nukleotide, die bei Bakterien nicht natürlich vorkommen.
- 14. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Nucleinsäuremolekül dadurch oder zusätzlich dadurch modifiziert bzw. markiert ist, daß es in einer für analytische Nachweisverfahren an sich bekannten

Weise eine oder mehrere radioaktive Gruppen, farbige Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Gruppen zur Immobilisierung an fester Phase und/oder Gruppen für eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere eine enzymatische Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen, und/oder anderweitig modifizierende oder modifizierte Gruppen nucleinsäureähnlichen Aufbaus aufweist.

- 15. Ein oder mehrere Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche in Gegenwart fakultativer Hilfsstoffe und in Form eines Kits für analytische Nachweisverfahren, insbesondere zum Nachweis von Bakterien der Gattung Pseudomonas.
- 16. Verwendung ein oder mehrerer Nucleinsäuremoleküle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 oder in Form eines Kits gemäß Anspruch 15 zum Nachweis der An- oder Abwesenheit von Bakterien, welche einer Gruppe von Bakterien der Gattung Pseudomonas angehören.
- 17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* umfaßt oder durch diese Stämme gebildet wird.
- 18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Gruppe von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* ausschließlich um *Pseudomonas aeruginosa-*Stämme handelt.
- 19. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nucleinsäurehybridisierung und/oder eine Nucleinsäureamplifikation durchführt.
- 20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß

man eine Polymerase-Kettenreaktion als Nucleinsäureamplifikation durchführt.

- 21. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man den Nachweis dadurch durchführt, daß man die nachzuweisenden Bakterien von nicht-nachzuweisenden Bakterien anhand von Unterschieden der genomischen DNA und/oder RNA an mindestens einer Nukleptidposition im Bereich eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 unterscheidet.
- 22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch *gekennzeichnet*, daß man anhand von Unterschieden im Bereich eines
  Nucleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 5 unterscheidet.